

Nrf2-小Maf因子によるシス配列認識の特殊性が酸化ストレスおよび外因性化学物質応答において重要である

著者	大槻 晃史
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16799号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00096803

学位論文要約

博士論文題目 Nrf2-小 Maf 因子によるシス配列認識の特殊性が酸化ストレスおよび外因性ストレス
応答において重要である

.....東北大学大学院医学系研究科.....医科学専攻

.....生体機能学講座.....医化学分野

学籍番号.....B2MD5018.....氏名.....大槻 晃史.....

CNC (cap 'n' collar) 群転写因子と Maf (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene) 群転写因子は、塩基性領域ロイシンジッパー (bZIP) 構造を有する DNA 結合タンパク質であり、様々な遺伝子発現制御に関わっている。Maf 群因子は転写活性化ドメインの有無によって、それぞれ大 Maf 群因子、小 Maf 群因子と呼ばれるサブファミリーに分類される。CNC 群および Maf 群転写因子は、bZIP 構造を介して Maf ホモ二量体や CNC-小 Maf ヘテロ二量体を形成し、ゲノム上の特定の DNA 配列 (シス配列) を認識する。

Maf ホモ二量体は、MARE (Maf recognition element; Maf 認識配列) を認識する。MARE のコンセンサス配列は回文状の 5'-TGCTGA (G/C) TCAGCA-3'であり、Maf ホモ二量体の結合には、配列の両端の GC 配列 (下線部) が重要であることが知られている。一方で、CNC-小 Maf ヘテロ二量体が認識する DNA 配列は、二量体を構成する転写因子に応じて、NF-E2 結合配列 (5'-ATGA (G/C) TCAGCA-3') や ARE (antioxidant response element; 抗酸化剤応答配列) /EpRE (electrophile responsive element; 親電子性物質応答配列) (5'-(A/G) TGA (G/C) NNNGC-3') と呼ばれている。これらのモチーフは、本質的には同一で、MARE と同様のコア配列 (5'-TGA (G/C) TCA-3') と、モチーフ片側のみに存在する GC 配列 (下線部) から構成されている。そのため、これらの配列を総称して、CsMBE (CNC-sMaf binding element; CNC-小 Maf 結合配列) と呼ぶ。CsMBE と MARE のコンセンサス配列を比較すると、モチーフ 5'端に存在するわずかな違いを除いて、非常に良く似ている。その類似性ゆえに、標的遺伝子選択において、CsMBE および MARE の間のわずかな違いが果たす重要性は今まで明らかではなかった。

CNC 群転写因子 Nrf2 は親電子性物質に応答して核移行し、小 Maf 群転写因子とヘテロ二量体を形成することで CsMBE を認識する。これによって、Nrf2-小 Maf ヘテロ二量体は酸化ストレスや親電子性物質に対する様々な生体防御遺伝子の発現を誘導することが知られている。その CsMBE 認識には、Nrf2 の DNA 結合ドメインの 502 番目に位置するアラニン (A) 残基が重要である。Maf 群因子も Nrf2 とよく似た DNA 結合ドメインをもっているが、502 番目の A に相当するアミノ酸残基はチロシン (Y) である。以前の解析から、Nrf2 の 502 番目の A を Y に置換した変異体 (Nrf2^{A502Y}) は、Maf 群因子様の DNA 配列認識をすることが報告されている。そこで、野生型 Nrf2 と Nrf2^{A502Y} 変異体の結合部位および標的遺伝子を比較することにより、CsMBE と MARE の制御下にある遺伝子群の違いを明らかにしようと考えた。

本研究では CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて、Nrf2^{A502Y} を発現するノックインマウスを樹立し、Nrf2^{A502Y} 結合部位の網羅的解析 (クロマチン免疫沈降シーケンス; ChIP-Seq 解析) と、網羅的遺伝子発現解析 (RNA シーケンス; RNA-Seq 解析) を行った。それらの解析を行うにあたり、Nrf2^{A502Y} ノックインマウスからチオグリコレート誘導性腹腔マクロファージを単離し、親電子性物質であるジエチルマレイン酸 (DEM) で処理することによって Nrf2 および Nrf2^{A502Y} を活性化させた。

まず、Nrf2^{A502Y} が野生型 Nrf2 と同様に、DEM 処理に伴って核蓄積することを確認したのちに、Nrf2 および Nrf2^{A502Y} 活性化条件において、両者の DNA 結合部位を網羅的に解析した。その結果、Nrf2^{A502Y} は、野生型 Nrf2 とは大きく異なるゲノム領域を認識することが明らかとなった。また、それらの結合領域に見られるコンセンサス配列を解析したところ、Nrf2^{A502Y} は、野生型 Nrf2 の標的配列である CsMBE よりも、むしろ MARE とよく似たモチーフに対して親和性を示すことが、マウス個体レベルで明らかになった。次に、Nrf2 と Nrf2^{A502Y} の標的遺伝子の違いを明らかにするため、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、Nrf2^{A502Y} マウスでは、グルタチオン合成や過酸化水素の消去といった、親電子性物質誘導的な Nrf2 標的遺伝子の発現が著しく減弱していることが明らかになった。また、発現が減弱した遺伝子の近傍には Nrf2^{A502Y} 結合が見られなかった。これらの結果から、Nrf2^{A502Y} は CsMBE 認識能を失い、その結果、本来の Nrf2 標的遺伝子を発現誘導できなくなったと言える。最後に、Nrf2^{A502Y} ノックインマウスにアセトアミノフェンを投与し、酸化

(書式 18) 課程博士

ストレスによる急性肝障害を誘導したところ、**Nrf2**^{A502Y} ノックインマウスは野生型マウスと比べて、アセトアミノフェンによる急性肝障害に対して脆弱であった。この結果は、マクロファージを用いた解析結果とよく一致するものであった。

これらの一連の解析によって、CNC 群転写因子 **Nrf2** は **CsMBE** 認識を介して、**Maf** ホモ二量体の標的遺伝子とは全く異なった遺伝子群を制御していることと、そのような **DNA** 配列認識の特殊性が酸化ストレスや親電子性ストレス応答に重要な機構であることが明らかとなった。